



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 35 767 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 35 767.2
㉔ Anmeldetag: 7. 8. 1998
㉕ Offenlegungstag: 17. 2. 2000

㉖ Int. Cl. 7:
C 12 P 19/04
C 12 N 1/06
// (C12P 19/04,C12R
1:865)(C12N 1/06,
C12R 1:865)A61K
31/715

DE 198 35 767 A 1

㉗ Anmelder:
Kulicke, Werner-Michael, Prof. Dr., 22523 Hamburg,
DE

㉘ Vertreter:
Schmidt-Bogatzky, J., Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anw.,
21073 Hamburg

㉙ Erfinder:
Kath, Franziskus Karl Thomas, Dipl.-Chem., 20253
Hamburg, DE; Kulicke, Werner-Michael, Prof.
Dr.-Ing., 22523 Hamburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ㉚ Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*
- ㉛ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*. In einer ersten Verfahrensstufe werden die Hefezellen durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch soweit zerrissen, daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt sind. Die Zellwandbestandteile werden von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt. In einer zweiten Verfahrensstufe wird dann das gewonnene Zellwandmaterial gereinigt und gefriergetrocknet. Danach wird das Zellwandmaterial in einer dritten Verfahrensstufe einem enzymatischen Aufschluß unterzogen und das hierbei entstehende wasserunlösliche Glucan durch Zentrifugation als Feststoff und das wasserlösliche Mannan im Überstand gewonnen. Durch dieses Verfahren erfolgt eine hohe Ausbeute von Glucan und Mannan mit intakter nativer Struktur.

DE 198 35 767 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*.

Die Bedeutung des Immunsystems zur Abwehr von Krankheiten in menschlichen und tierischen Organismen ist bekannt. Es ist ferner allgemein bekannt, daß es in der Zellwand von Hefe Polysaccharide gibt, die in tierischen und menschlichen Organismen immunstimulierend wirken und zur Abwehr von Krankheiten eingesetzt werden können. Diese Polysaccharide sind Mannan und Glucan. Das Mannan, bestehend aus 1,2-, 1,3- und 1,6- α -glykosidisch verknüpften Mannose-Einheiten, ist an eine Protein-Matrix gebunden und sitzt auf der äußeren Zellwand der Hefezelle, während das Glucan 1,3- β -glykosidisch verknüpft ist mit wenigen 1,6- β -glykosidischen Seitenketten und sich in der inneren Zellwand befindet. Zur Isolierung dieser beiden Polysaccharide wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, bei denen durch Einwirkung von Säuren und Laugen die beiden Zellwandkomponenten getrennt werden. Bei diesen herkömmlichen Verfahren sind jedoch viele Verfahrensschritte erforderlich und darüber hinaus wird die native Struktur der Zellwand-Polysaccharide beschädigt, so daß die immunabwehrfördernden Effekte beeinträchtigt werden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, das Verfahren der eingangs genannten Art so zu gestalten, daß bei einer Verminderung der erforderlichen Verfahrensschritte ein optimaler immunmodulierender Effekt erzielt wird.

Erfindungsgemäß erfolgt die Lösung der Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung werden in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

Nach der Erfindung wird gegenüber den herkömmlichen sauren und alkalischen Extraktionen bei der Isolierung der Polysaccharide eine Degradation vermieden, da durch den Einsatz von Enzymen extreme pH-Werte vermieden werden. Außerdem wird die Anzahl der erforderlichen Verfahrensschritte deutlich reduziert. Gemäß der Erfindung werden zunächst über einen mechanischen Zellaufschluß die Zellwände vom Zellinneren abgetrennt und die erhaltenen Zellwandabschnitte gereinigt und gefriergetrocknet. Dann erfolgt eine Einwirkung von technischen Enzymen auf die isolierten Zellwandabschnitte der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*, wodurch die Substanzen rein isoliert werden können. Man erhält sowohl Mannan als auch Glucan, welche direkt für immunstimulierende Zwecke z. B. in Hautcremes eingesetzt werden können. Da das Glucan in Wasser unlöslich ist, kann es durch chemische Umsetzungen in wasserlösliche Derivate überführt werden. Hierzu sind zahlreiche Derivatisierungsmethoden bekannt. Es können spezielle Mannan-Komponenten isoliert werden, die Molmassen im Bereich von 20.000 bis 400.000 g/mol haben, eine spezifische, immunmodulierende Reaktion zeigen und dabei aber nicht cytotoxisch wirken. Diese Mannan-Komponenten können auch zur Bekämpfung von Asthma-Erkrankungen genutzt werden. Zur Isolierung der Polysaccharide können vorteilhaft Enzyme eingesetzt werden, wie Protease (SIGMA-ALDRICH), Pronase (MERCK), beide aus *Streptomyces griseus*, Lyticase, auch Zymolyase genannt (SIGMA-ALDRICH), wie auch Enzymcocktails aus *Helix pomatia* und aus *Cytophaga* (MERCK). Es ist aber auch die Verwendung anderer geeigneter Enzyme oder Enzymcocktails möglich.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand der in der Zeichnung schematisch dargestellten Verfahrensabläufe näher erläutert.

Die Hefezellen 1 werden in der ersten Verfahrensstufe A

durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch zerrissen, so daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt werden. Hierzu wird ein Mahlbehälter 2 mit einer Suspension aus Hefezellen und Glasperlen gefüllt und in z. B. einer Schwingmühle 3 mit hoher Frequenz geschüttelt. Als Glasperlen werden vorzugsweise solche mit einem Durchmesser von 0,75–1,5 mm verwendet. Die Frequenz der Schwingmühle 3 beträgt z. B. 1600 s⁻¹. Das so gewonnene Zellwandmaterial 4 wird dann in einer weiteren Verfahrensstufe B durch Zentrifugation gereinigt oder aber an mikroporösen Membranen durch Waschen gereinigt. Das so aufbereitete Zellwandmaterial 4 wird dann gefriergetrocknet. In der dann folgenden Verfahrensstufe C wird das Zellwandmaterial 4 einem enzymatischen Aufschluß unterzogen. Spezifische Enzyme wie Pronase oder Glucanase oder spezifische Enzymcocktails wie Zymolyase, *Cytophaga*, *Helicase* oder *Cellulase* zerstören in der äußeren Zellwand des Zellwandmaterials 4 die Proteinmatrix und setzen lösliches Mannan 5 frei. Das unlösliche Glucan 6 wird durch Zentrifugation abgetrennt und gesondert aufbereitet. Das Mannan 5 kann durch Dialyse oder chromatographisch gereinigt werden.

Nachstehend werden zwei Ausführungsbeispiele der Erfindung beschrieben:

1. Ausführungsbeispiel

5,0 g Hefezellwände aus dem mechanischen Aufschluß wurden in 115 ml Trispuffer-Lösung (Tri(hydroxymethyl)aminoethan, mit Salzsäure auf pH = 7,5 eingestellt) suspendiert und auf 37,0°C temperiert. 10,6 mg Pronase E (*Streptomyces griseus*, Fa. MERCK) wurden in 5 ml Puffer-Lösung gelöst und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach sechs Stunden wurde der Feststoff abzentrifugiert und der Überstand dialysiert. Nach Gefriertrocknung erhielt man Mannan aus dem Überstand, während im Feststoff 2,9 g Glucan zu finden sind.

2. Ausführungsbeispiel

1,55 g Hefezellwände aus dem mechanischen Aufschluß wurden in 60 ml Trispuffer-Lösung (Tri(hydroxymethyl)aminoethan, mit Salzsäure auf pH = 7,5 eingestellt) suspendiert und auf 37,0°C temperiert. 462 mg Protease (*Streptomyces griseus*, Fa. SIGMA) wurden in 5 ml Puffer-Lösung gelöst und zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach 6,5 Stunden wurde der Feststoff abzentrifugiert und der Überstand dialysiert. Nach Gefriertrocknung erhielt man 352 mg Mannan aus dem Überstand, während im Feststoff 522 mg Glucan zu finden sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einer ersten Verfahrensstufe A die Hefezellen durch Einwirkung von Scherkräften mechanisch soweit zerrissen werden, daß die Zellwände vom Zellinneren getrennt sind und daß dann die Zellwandbestandteile von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt werden, daß dann in einer zweiten Verfahrensstufe B das in der ersten Verfahrensstufe A gewonnene Zellwandmaterial gereinigt und gefriergetrocknet wird und daß dann das Zellwandmaterial in einer dritten Verfahrensstufe C einem enzymatischen Aufschluß unterzogen und das hierbei entstehende wasserunlösliche Glucan durch Zentrifugation als Feststoff und wasserlösliche Mannan im Überstand gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der ersten Verfahrensstufe A gewonnenen Zellwandbestandteile durch Zentrifugation von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt und vor der Gefriertrocknung gereinigt werden. 5
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in der ersten Verfahrensstufe A gewonnenen Zellwandbestandteile an mikroporösen Membranen von den Bestandteilen des Zellinneren getrennt und durch Waschen vor der Gefriertrocknung gereinigt werden. 10
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gefriergetrockneten Zellwandbestandteile in einem Puffersystems bei einem pH-Wert von 3,0 bis 11 bei Temperaturen zwischen 20°C und 50°C über einen Zeitraum von vier bis 30 Stunden mit enzymatischen Aufschlußmitteln zur Reaktion gebracht werden. 15
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel Proteasen aus *Streptomyces griseus* und/oder *Lyticase* (*Zymolyase*) verwendet werden. 20
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel Enzymcocktails aus *Helix pomatia* und/oder aus *Cytophaga* verwendet werden. 25
7. Verfahren nach Anspruch 1, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß als enzymatisches Aufschlußmittel ein Gemisch aus Enzymen und Enzymcocktails verwendet wird. 30

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

35

40

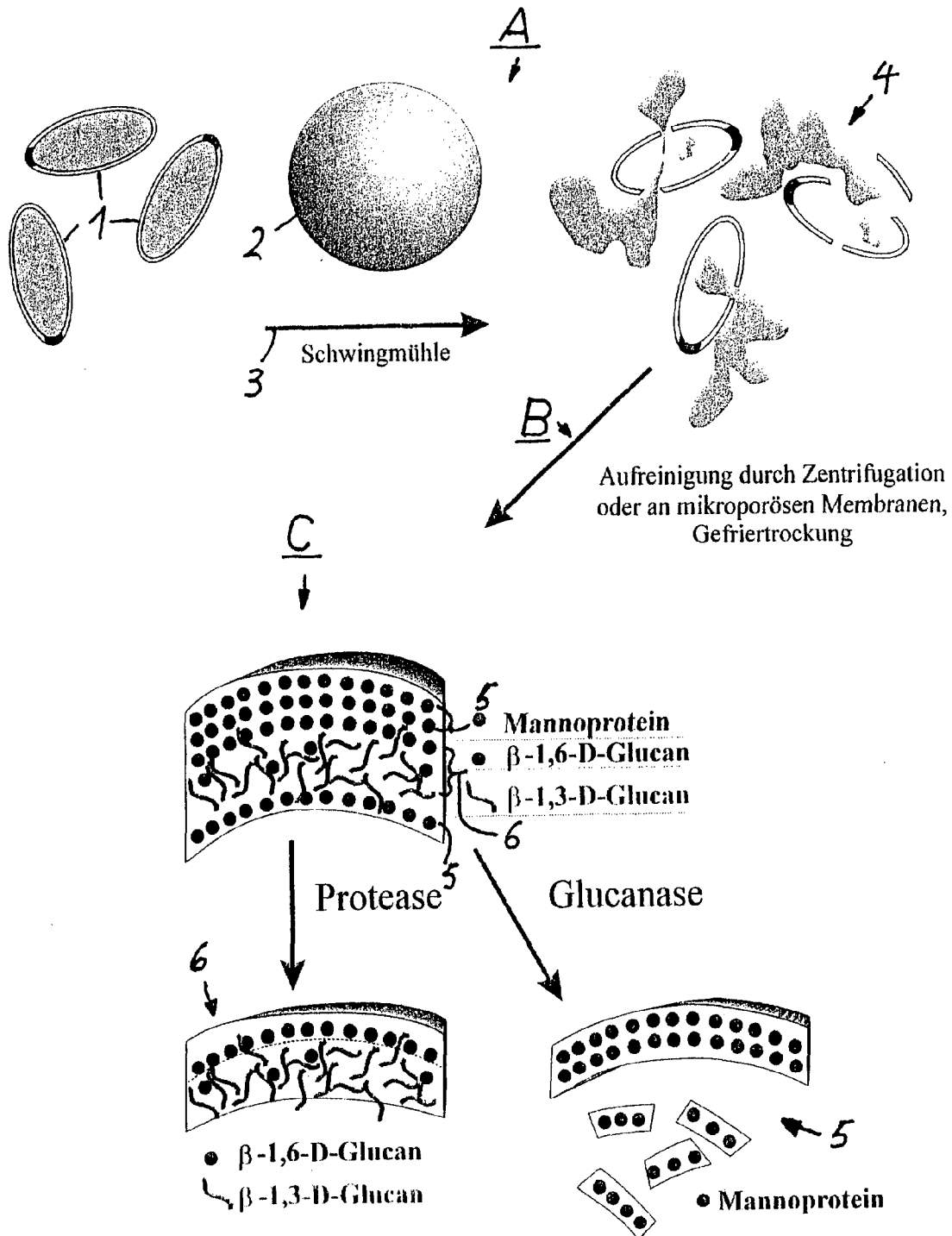
45

50

55

60

65



Glucan und Mannan

Verfahren zur Gewinnung hochmolekularer biologisch aktiver immunmodulierender Polysaccharide aus Hefe *Saccharomyces Cerevisiae*

Publication number: DE19835767

Publication date: 2000-02-17

Inventor: KATH FRANZISKUS KARL THOMAS (DE); KULICKE WERNER-MICHAEL (DE)

Applicant: KULICKE WERNER MICHAEL (DE)

Classification:

- **international:** **C12P19/04; C12P19/00;** (IPC1-7): A61K31/715; C12P19/04; C12N1/06; C12P19/04; C12R1/865; C12N1/06; C12R1/865

- **European:** A61K35/72; C12P19/04

Application number: DE19981035767 19980807

Priority number(s): DE19981035767 19980807

Also published as:



WO0008201 (A1)

WO0008201 (A1)

[Report a data error here](#)

Abstract of **DE19835767**

The invention relates to a method for obtaining high molecular biologically active immunomodulating polysaccharide from *Saccharomyces cerevisiae* yeast. In a first step, the yeast cells are mechanically disintegrated under the effect of shear forces in such a way that the cell walls are separated from the inner part of the cell. In a second step, the cell wall material obtained is purified and dried. The cell wall material is then subjected to enzymatic digestion in a third step and the aqueous insoluble glucan thus formed is obtained as a solid by centrifugation and the aqueous soluble mannan is obtained in the supernatant. Said method makes it possible to obtain high yields of glucan and mannan with intact native structure.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide